Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 1, Apr. May. 2022, p. 129- 138

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۱ ص.۱۳۸-۱۲۹

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Aflatoxin contaminated cocoa beans classification using near-infrared spectroscopy

Ali Saeidan[1], Mehdi Khojastehpour[1*], Mahmood Reza Golzarian[1], Marzieh Moeinfard[2]

Received: 2021.01.27
Accepted: 2021.02.23

How to cite this article:
Saeidan, A., Khojastehpour, M., Golzarian, M. R., Moeinfard, M., (2022). Aflatoxin contaminated cocoa beans classification using near-infrared spectroscopy. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18*(1), 129-138.

Abstract

Introduction: Due to the fact that the presence of high doses of aflatoxin in agricultural products such as cocoa beans is unacceptable in terms of national and international standards, appropriate quality control tests should prevent such products to entering in the process of processing cocoa beans. Conventional methods of detecting aflatoxins such as ELISA and HPLC are very time consuming, expensive and require expertise, so replacing these tests with non-destructive and rapid methods such as near-infrared spectroscopy can increase the detection efficiency. Brado et al. (Berardo et al., 2005) used infrared spectroscopy to evaluate and diagnose Fusarium verticillium, which produces fumonicin toxin in maize. Manvar et al. (Mohammadi Manvar, 2015) used transmission and reflection Infrared spectroscopy to detect aflatoxin levels in Iranian pistachios. Singh et al. (2012) used hyperspectral imaging in the range of 700-1100 nm to detect fungal contamination of Penicillium SPP, Aspergillus Glaucus, and Aspergillus Niger in wheat. Kandpal et al. (Kandpal et al., 2015) in a research work using hyperspectral imaging in the range of 700-1100nm classified grains of maize contaminated with aflatoxin toxin using PLS-DA into five groups. In current study, an attempt was made to detect the amount of aflatoxin in cocoa beans using infrared spectroscopy and to classify healthy and infected beans into groups.

Materials and Methods: In this research, 180 cocoa beans, each weighing 1 gram, were selected to do analyses. One mg of aflatoxin B1 powder (A. flavus, A 6636, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo USA) was prepared from Sigma Aldrich representative in Iran and by dissolving this powder in absolute ethanol and concentrations of 20µg/kg, 500µg/kg was obtained as mentioned. For cocoa bean spectroscopy, a near infrared spectrometer in Shiraz University Central Laboratory (NIRS XDS Rapid Content Analysis) was used, which has the ability to spectroscopy in the range of 400-2500 nm. PLS-DA method was used to classify aflatoxin-infected samples from healthy samples. All 180 experimental samples were divided into two groups of training (120 samples) and test (60 samples) and the constructed model was first calibrated with training values and then evaluated with test data. Due to the fact that some noise is always stored in the spectral data and in order to remove this noise, a series of mathematical pretreatment, including: first and second derivatives was used (Chen et al., 2013; Nicolai et al., 2007).

Results and Discussion: Comparing the average amount of infrared reflection spectrum, it is revealed that healthy grains have less reflection intensity than infected grains. Also, there are a number of local maximums and minimums where the difference in reflective intensity is more pronounced than elsewhere, and this phenomenon is due to the different concentrations of toxins in cocoa beans. After applying the second Savitzie Golay derivative pretreatment and performing PLS-DA classification using two latent variables, the distinction between classes can be clearly seen. The separation rate of the samples on the second LV is more specific, however, the second and first class samples in this LV have a closer score to each other. The peaks observed at 1440 nm and 1482 nm according to the first Everton O-H bond can be related to fungal contamination (Berardo et al., 2005; Sirisomboon et al., 2013). Also, the peak at 1838 nm is related to the tensile C-H bond, which can be related to the CH2 groups. According to the results obtained from the calibration, cross-validation and testing sections, it is determined that the degree of calibration error (ER) and the degree of error-free calibration

---

1. Department of Biosystems Engineering, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, PO-Box: 9177948944.
(∗ Corresponding Author's Email: mkhpour@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68475.1016

(NER) in the pretreatment mode with the second-order derivative of Savitz Golay are the lowest and highest values, respectively. Also, in this pretreatment for the calibration model and testing, the specificity index for the first-, second- and third-class samples are equal to 1.00, which means that all classes are correctly classified. In the cross-validation model, the value of the specificity index for the third class (samples with 500 ppb contamination) is equal to 97%. This indicates that 97% of infected seeds are correctly classified in the third group and only 3% in the other groups are incorrectly classified.

Conclusion: The present study demonstrates the feasibility of near-infrared spectroscopy to identify and classify cocoa beans contaminated with aflatoxin. The results showed that the coefficients of independent variables (spectral wavelengths including 1440, 1482 and 1838 nm) decreased according to increasing in the concentration of toxin. Finally, it can be said that the method of detecting aflatoxin contamination using infrared spectroscopy is an efficient, non-destructive and fast method.

Keywords: Aflatoxin, Cocoa bean, Spectroscopy, PLS_DA.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 1, Apr. May. 2022, p. 129-138

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۱ ص.۱۳۸-۱۲۹

مقاله علمی-پژوهشی

درجه‌بندی دانه‌های کاکائو آلوده به آفلاتوکسین با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک

علی سعیدان[۱]- مهدی خجسته‌پور*[۲]- محمودرضا گلزاریان[۳]- مرضیه معین‌فرد[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۵

چکیده

آفلاتوکسین یک ترکیب شیمیایی سمی است که توسط قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتکوس* تولید می‌شود. این سموم قارچی می‌توانند باعث آلودگی گسترده محصولات کشاورزی شوند که به‌صورت بالقوه دارای خطرات زیادی برای سلامتی انسان و حیوان هستند. لذا تشخیص سریع و صحیح دانه‌های آلوده به آفلاتوکسین به لحاظ اقتصادی و ایمنی، از اهمیت بالایی برخوردار است. در این تحقیق از طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک به‌عنوان روشی غیرتخریبی و سریع، برای تشخیص دانه‌های کاکائو آلوده به آفلاتوکسین استفاده شد. دانه‌های کاکائو با دو غلظت سم (۲۰و ppb ۵۰۰) به‌صورت مصنوعی آلوده شدند و دانه‌های بدون آلودگی نیز به‌صورت سطحی با اتانول پاکسازی شدند. هر دو دسته دانه‌های آلوده و سالم با دستگاه طیف‌سنج و در دامنه ۴۰۰ الی ۲۵۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. مدل تجزیه و تحلیل تمایزی حداقل مربعات جزئی برای دسته‌بندی دانه‌های آلوده و غیرآلوده مورد استفاده قرار گرفت و پیش از آنالیز داده‌های طیفی، این طیف‌ها با مشتق مرتبه اول و دوم ساویتزی گولی مورد پیش تیمار قرار گرفتند. نتایج درجه‌بندی نشان داد که کمترین میزان خطای درجه‌بندی در حالتی بود که از مشتق مرتبه دوم به‌عنوان پیش تیمار استفاده شده بود و این مقادیر برای داده‌های کالیبراسیون، اعتبارسنجی متقابل و تست به‌ترتیب برابر ۰/۰۰، ۰/۰۲ و ۰/۰۰ گزارش شد. همچنین نتایج بررسی نمودار ضرایب تاثیر در هر دسته نشان داد که با افزایش غلظت سم در دانه های کاکائو از ۲۰ به ppb ۵۰۰، مقادیر ضرایب تاثیر کاهش پیدا کرد. در نهایت می‌توان گفت که روش تشخیص آلودگی آفلاتوکسین با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز روشی کارا، غیرمخرب و سریع می‌باشد که می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های سنتی شود.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، دانه کاکائو، طیف‌سنجی مادون قرمز، PLS_DA.

مقدمه

دانه کاکائو در اصل میوه درخت تئوروبروما است و در آمریکای مرکزی و جنوبی و نیز قسمت‌هایی از آسیا و آفریقا کشت می‌شود. مجموع تولید جهانی دانه کاکائو حدود ۳/۹۸ میلیون تن در سال است و این محصول کشاورزی یکی از افزودنی‌های مهم در تولید مواد غذایی همچون کیک، بیسکوئیت، غذای کودکان، بستنی، شکلات و شیرینی‌جات به‌شمار می‌رود (Magan & Aldred, 2005). به علت عدم رعایت استانداردهای بهداشتی در مراحل مختلف فرآوری دانه کاکائو و نیز حمل و نقل و انبارکردن ناصحیح آن احتمال آلوده شدن دانه‌ها به انواع سموم قارچی از جمله آفلاتوکسین وجود دارد (Broadent & Oyeniran, 1968; Roelofsen, 1958).

آفلاتوکسین نوعی متابولیت ثانویه است که توسط برخی قارچ‌ها مانند *آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تولید می‌شود. انواع مختلفی از آفلاتوکسین در طبیعت وجود دارد (بیش از ۱۴ نوع)، اما چهار نوع آن یعنی B1، B2، G1 و G2 به‌لحاظ سلامتی برای انسان و حیوانات خطرناک‌تر هستند چرا که در اغلب محصولات کشاورزی مورد استفاده توسط این گروه‌ها، یافت می‌شوند. با وجود اینکه در منابع متعدد، وجود آلودگی قارچی در دانه کاکائو مشاهده شده ولی خوشبختانه میزان آفلاتوکسین در این موارد کم گزارش شده است. با این حال باید در نظر گرفت که مصرف دانه‌های آلوده به آفلاتوکسین حتی در مقادیر پایین آن نیز در دراز مدت باعث ایجاد سرطان، مسمومیت کبدی، جهش و اختلالات ژنتیکی برای انسان و حیوان می‌شود (Ardhana & Fleet, 2003; Mounjouenpou *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 1986; Sánchez-Hervás *et al.*, 2008). بررسی منابع Copetti و همکاران در سال‌های ۲۰۱۳ و ۲۰۱۲ بیانگر وجود آفلاتوکسین به میزان 17mg/kg در ۲ نمونه از ۹ نمونه دانه کاکائو مورد آزمایش بود. همچنین با در نظر گرفتن احتمال وجود آفلاتوکسین در محصولات به‌دست آمده از دانه کاکائو مانند شکلات، در کشور آلمان پروژه‌ای انجام شد و نتایج

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی،دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
(* ایمیل نویسنده مسئول: mkhpour@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68475.1016

این تحقیق نشان داد که ۷۳/۵ درصد از ۳۳۴ محصول مورد آزمایش قرار گرفته، رد پایی از آفلاتوکسین را دارا می‌باشند.

امواج مادون قرمز نزدیک (NIR)[1] محدوده‌ای از امواج الکترومغناطیسی است با طول موج حدود ۷۰۰ الی ۲۵۰۰ نانومتر. در طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک، جذب تابش توسط ماده منجر به انتقالات الکترونی در ترازهای ارتعاشی مولکول‌ها می‌شود. این روش به‌عنوان روشی کارا و توسعه‌یافته برای تعیین ساختار و اندازه‌گیری گونه‌های شیمیایی در اختیار شیمیدانان قرار دارد. کاربرد طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک به‌عنوان روشی سریع و غیرمخرب به‌منظور شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی در بسیاری از محصولات به اثبات رسیده است. مزیت‌های اصلی طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک عبارتند از: الف) عدم نیاز به آماده‌سازی نمونه، از آنجائیکه باندها در مادون قرمز نزدیک به‌طور عمده لایه‌های فرعی و ترکیبات نمونه می‌باشند، لذا شدت کمتری از باندهای ناحیه میانه مادون قرمز را دارا می‌باشند. به این دلیل نمونه‌ها را می‌توان به‌طور مستقیم بدون هیچ‌گونه رقیق‌سازی و تهیه محلول اندازه گیری نمود. ب) عدم اتلاف و ضایعات نمونه: از آنجائیکه نمونه به‌طور مستقیم اندازه‌گیری و حفظ می‌شود، روش‌های طیف‌سنجی ایده‌آل می‌باشند. بنابراین، در این روش‌ها هیچ گونه آماده‌سازی خسته‌کننده نمونه و هیچ‌گونه مواد مضر مانند حلال‌های سمی وجود ندارد ندارد (Khodabakhshian *et al.*, 2016). این روش، سریع، دقیق و غیرمخرب است و برخلاف روش‌های کروماتوگرافی به مهارت بسیار بالای کاربر نیاز ندارد. این روش برای آنالیز میزان پروتئین در برنج (Zhang *et al.*, 2007). میزان قند در میوه‌ها (Camps & Christen, 2009) میزان پکتین در هلوهای ژاپنی (Sirisomboon *et al.*, 2007) و شناسایی میکروارگانیزم‌ها در آبمیوه (Al-Holy *et al.*, 2006) مورد استفاده قرار گرفته است. این روش به‌صورت موفقیت‌آمیزی برای تشخیص مایکوتوکسین‌ها و آلودگی‌های ناشی از سموم قارچی در تعدادی از محصولات کشاورزی استفاده شده است. برخی از این تحقیقات عبارتند از: بررسی محتویات دی‌اکسی نیوانول در دانه‌های گندم (Pettersson & Åberg, 2003) تشخیص آفلاتوکسین و آکراتوکسین A در پاپریکای قرمز (Hernández-Hierro *et al.*, 2008) و همچنین شناسایی آفلاتوکسین B1 در ذرت و جو (Fernández-Ibañez *et al.*, 2009). Berardo و همکاران (۲۰۰۵) طیف‌سنجی مادون قرمز را برای ارزیابی و تشخیص فوساریوم ورتیسیلیود را که در ذرت باعث تولید سم فومونیسین می‌شود به‌کار بردند. Mohammadi Monavar و همکاران (2016) با استفاده از طیف‌سنجی عبوری و بازتابی مادون قرمز توانستند میزان آفلاتوکسین را در پسته‌های ایرانی تشخیص دهند. آن‌ها در کار خود از روش HPLC به‌عنوان روش مرجع برای ارزیابی آلودگی آفلاتوکسین استفاده نمودند و در تجزیه و تحلیل داده‌های طیف از روش تحلیل مؤلفه‌های اصلی و همچنین رگرسیون حداقل مربعات جزئی استفاده کردند. نتایج بررسی‌های آن‌ها نشان داد که بیشتر از ۹۵ درصد نمونه‌های دارای آلودگی به درستی درجه‌بندی شدند. Singh و همکاران (۲۰۱۲) از تصویربرداری ابرطیفی[2] در دامنه ۷۰۰–۱۱۰۰ نانومتر استفاده کردند تا آلودگی‌های قارچی *Aspergillus Glaucus*، *Penicillium SPP* و *Aspergillus* را در گندم شناسایی کنند. Kandpal و همکاران (۲۰۱۵) در یک کار تحقیقی با استفاده از تصویربرداری ابرطیفی در دامنه ۱۱۰۰–۷۰۰ نانومتر دانه‌های آلوده ذرت به سم آفلاتوکسین را با استفاده از کلاس‌بند PLS-DA به پنج گروه ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ppb و گروه کنترل (بدون آلودگی) تقسیم‌بندی کردند. نتایج نشان داد که کلاس‌بند پیشنهادی با دقت ۹۶/۹ درصد توانست دانه‌ها را در گروه‌های صحیح خود طبقه‌بندی کند.

با توجه به اینکه وجود دوزهای بالای سم آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی مانند دانه کاکائو که به‌عنوان مواد اولیه کارخانجات صنایع غذایی به‌شمار می‌آیند از نظر استانداردهای ملی و بین‌المللی غیرقابل قبول می‌باشد باید با انجام آزمایشات کنترل کیفی مناسب مانع ورود چنین محصولاتی در مراحل فرآوری دانه کاکائو شد. روش‌های مرسوم و سنتی تشخیص آفلاتوکسین مانند تست الایزا و آنالیز به روش HPLC بسیار زمانبر، پرهزینه و نیازمند نیروی متخصص می‌باشند به همین جهت جایگزینی این آزمایشات با روش‌هایی غیرمخرب و سریع مانند استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک می‌تواند بازده تشخیص را افزایش دهد. با بررسی منابعی که در مقدمه به آن‌ها اشاره گردید مشخص شد که کاربرد طیف‌سنجی مادون قرمز برای تشخیص آفلاتوکسین در تعدادی از محصولات کشاورزی به‌کار رفته است ولی موردی گزارش نشده است که از این روش برای تشخیص و درجه‌بندی دانه‌های کاکائو آلوده به آفلاتوکسین استفاده شده باشد. به همین علت در این تحقیق سعی شد تا با استفاده از روش طیف‌سنجی مادون قرمز میزان آفلاتوکسین در دانه‌های کاکائو تشخیص و نیز دانه‌های سالم و آلوده درگروه‌هایی جداگانه درجه‌بندی شوند.

مواد و روش‌ها

آماده کردن نمونه‌ها

در حدود یک کیلوگرم دانه کاکائو تخمیر شده و بدون عیوب ظاهری از یک کارخانه فرآوری دانه کاکائو در تبریز–ایران خریداری شد و پس از وزن کردن دقیق، ۱۸۰ عدد دانه که وزن هرکدامشان به‌طور میانگین یک گرم بود برای آزمایش انتخاب گردید. یک میلی‌گرم پودر آفلاتوکسین B1 (A.flavus, A 6636, Sigma-Aldrich, st.Luis,

1 Near Infrared Spectroscopy (NIR)

2 Hyperspectral Imaging (HIS)

Mo USA) از نمایندگی سیگما آلدریچ در ایران تهیه گردید و با حل کردن این پودر در اتانول ۱۰۰ درصد غلظت‌های ۲۰ و ۵۰۰ µg/kg به‌صورتی که ذکر می‌شود به‌دست آمد (شکل ۱-A و B). یک میلی‌گرم پودر آفلاتوکسین A6636 را در یک میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰ درصد حل گردید (غلظت برابر $1 \mu g/\mu l$). سپس یک میلی‌لیتر از محلول به‌دست آمده را با ۱۹۹ میلی‌لیتر اتانول خالص حل نموده و با استفاده از رابطه ۱ غلظت محلول استوک ۰/۰۰۵ µg/µl به‌دست آید. با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به هر کدام از ۶۰ دانه کاکائو گروه اول طبق رابطه ۲ میزان سم را در هر دانه به مقدار ۵۰۰µg/kg (۵۰۰ppb) به‌دست آمد.

$$W = A \times q \qquad (1)$$

$$Q = \frac{W}{m} \qquad (2)$$

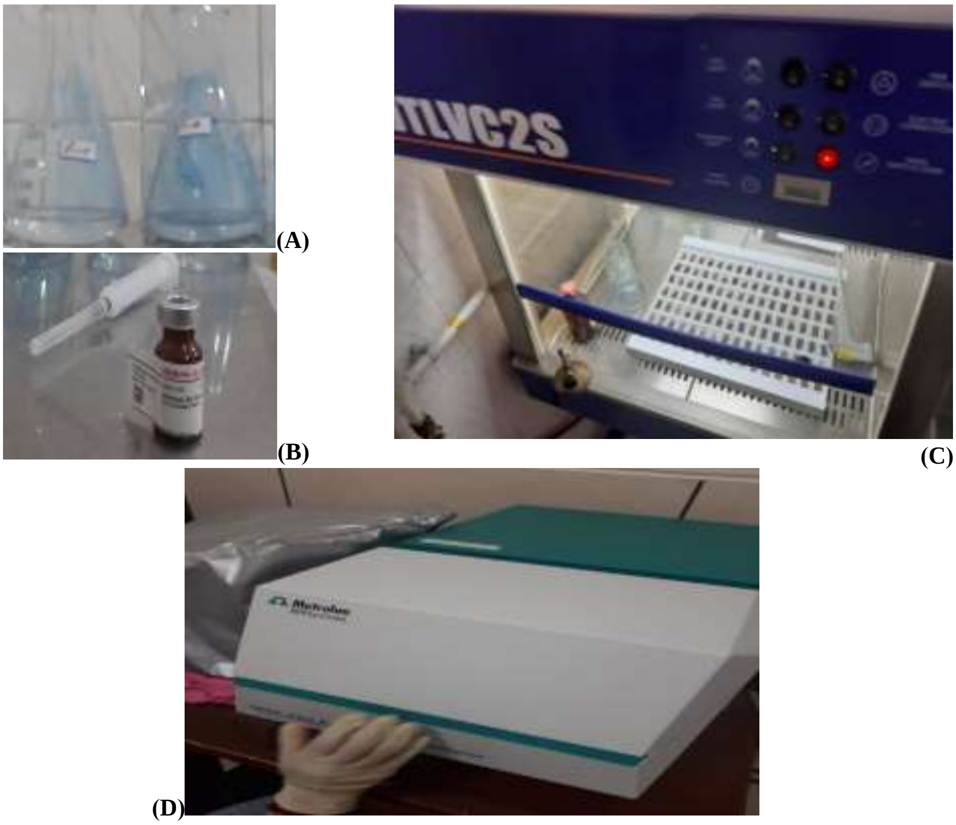
W= وزن سم در یک دانه کاکائو بر حسب میکروگرم

A=۱۰۰ میکرولیتر (ضریب ثابت)

q= غلظت محلول استوکس بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر

m= وزن یک دانه کاکائو بر حسب گرم

برای تهیه غلظت ۲۰ µg/kg، دو میلی‌لیتر از محلول به‌دست آمده را با چهل و هشت میلی‌لیتر اتانول خالص حل نموده تا غلظت سم برابر با ۲۰ µg/kg (۲۰ppb) به‌دست آید. برای جلوگیری از خطرات ناشی از سم آفلاتوکسین، کلیه عملیات آلوده‌سازی مصنوعی نمونه‌های دانه کاکائو در زیر هود آزمایشگاهی و در یک آزمایشگاه تخصصی میکروبی در شهر تبریز انجام گرفت (شکل ۱- C).



شکل ۱- مراحل مختلف آلوده کردن مصنوعی نمونه ها به سم آفلاتوکسین و سپس طیف سنجی از نمونه ها: (A)- آماده سازی محلول سم در دو غلظت ۲۰ppb و ۵۰۰ppb . (B)- پودر آفلاتوکسین A6636 شرکت سیگما (C)- آلوده سازی نمونه ها زیر هود آزمایشگاهی (D)- دستگاه طیف سنج مادون قرمز نزدیک

Fig. 1. Different stages of artificial contamination of samples with aflatoxin and then spectroscopy of the samples. (A) Preparation of toxin solution at two concentrations of 20 and 500 ppb. (B) Aflatoxin A6636 powder from Sigma Company. (C) Contamination of samples under fume hood. (D) Near infrared spectrometer.

طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک (NIR)

همانطور که در شکل (۱- D) مشاهده می‌شود برای طیف‌سنجی دانه کاکائو از یک دستگاه طیف‌سنج مرئی- مادون قرمز نزدیک در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شیراز (NIRS XDS Rapid Content Analysis) که مجهز به پراب فیبر نوری است و قابلیت طیف‌سنجی در محدوده ۲۵۰۰-۴۰۰ نانومتر را دارد، استفاده گردید. یک منبع نوری از نوع هالوژن تنگستن به‌عنوان منبع نوری به‌کار گرفته شد و از هر نمونه دانه کاکائو دو طیف از دو طرف سطح دانه ثبت شده و برای انجام

مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق از روش بازتابی استفاده شد

در این تحقیق از روش تجزیه و تحلیل تمایزی حداقل مربعات جزئی برای جداسازی نمونه‌های آلوده به آفلاتوکسین از نمونه‌های سالم استفاده شد. در حقیقت، PLS_DA یک روش برای طبقه‌بندی خطی بازشناسی الگوی نظارت شده است که بر اساس رگرسیون کمترین مربعات جزئی بنا نهاده شده است. این روش به‌دنبال متغیرهای پنهانی است که بیشترین کوواریانس را با متغیرهایی دارند که عضویت نمونه‌ها در گروه‌های مختلف (گروه کنترل و گروه‌های آلوده با غلظت مختلف آفلاتوکسین) را نشان می‌دهد به‌علاوه این روش قادر به تحلیل مسائل چند متغیره به‌خصوص مسائلی که مقادیر زیادی اطلاعات طیفی را دارند به‌صورت کمی و کیفی می‌باشد. در این روش، متغیر پاسخ (Y) دسته‌ای از متغیرهای دوتایی[1] است که به دسته نمونه‌ها مربوط می‌شود. این روش معمولا به‌صورت رابطه ۳ بیان می‌شود.

$$Y = X \times b + E \qquad (۳)$$

که در آن X یک ماتریس $n \times p$ است و مقادیر طیفی هر دسته را در خود نگه داشته است، $b = (b1, b2, \ldots, bn)^T$ ضرایب رگرسیونی می‌باشد. حرف T نشانگر ماتریس ترانهاده و E بیانگر مقادیر خطا می‌باشد. در این تحقیق برای ساختن مدل PLS-DA اطلاعات طیفی در ماتریس Y قرار گرفت و ماتریس Y که بیانگر دسته نمونه‌های آلوده به آفلاتوکسین و نمونه‌های سالم بود به‌صورت زیر مرتب گردید.

$$Y = \begin{cases} ۰ & \text{دانه کاکائو بدون آلودگی} \\ ۱ & \text{دانه کاکائو دارای آلودگی } ۲۰\ ppb \\ ۲ & \text{دانه کاکائو دارای آلودگی } ۵۰۰\ ppb \end{cases}$$

تمام ۱۸۰ نمونه آزمایش به دو گروه آموزش (۱۲۰ نمونه) و تست (۶۰ نمونه) تقسیم شدند و مدل ساخته شده ابتدا با مقادیر آموزش کالیبره گردید و سپس با داده های تست مورد ارزیابی قرار گرفت (Kandpal *et al.*, 2015; Mobli *et al.*, 2020).

پیش تیمار طیفی

با توجه به اینکه همواره مقداری اختلال (Noise) در داده‌های طیفی توسط طیف‌سنج ذخیره می‌شود به‌منظور حذف این نویزها از یک سری روش‌های ریاضی پیش تیمار طیف که شامل: هموارسازی ساویتزی گولی[2]، مشتق اول و دوم[3] استفاده گردید. مشتق‌گیری که شامل مشتق اول و دوم است برای از بین بردن پس‌زمینه و افزایش دقت طیف‌ها استفاده می‌شود. مشتق مرتبه اول با محاسبه شیب بر هر نقطه طیف اکتسابی، علاوه بر یکنواخت کردن اثرات جابه‌جایی نقطه شروع طیف‌ها را نیز برطرف می‌کند. با استفاده از پیش پردازش مشتق دوم علاوه بر از بین رفتن اثرات جابجایی نقطه شروع و یکنواخت شدن طیف‌ها، تغییر فرم‌های ایجاد شده در ظاهر طیف (ناشی از تغییر فاصله آشکارساز با نمونه) از بین رفته و علاوه بر آن پیک‌های ضعیف موجود در طیف به‌صورت واضح‌تر و برجسته‌تر نشان داده می‌شوند (Chen *et al.*, 2013; Nicolai *et al.*, 2007).

ارزیابی دقت درجه‌بندی

برای ارزیابی مدل DA-PLS به‌دست آمده، از معیارهای ضریب حساسیت[4]، ضریب تعیین[5]، خطا در طبقه‌بندی[6] و درجه‌بندی بدون خطا[7] استفاده گردید. این معیارها بصورت روابط ۴ تا ۷ نشان داده شده‌اند (Mobli *et al.*, 2020).

$$\text{ضریب حساسیت} = \frac{TP}{TP+FN} \qquad (۴)$$

$$\text{ضریب تعیین} = \frac{TN}{TN+FN} \qquad (۵)$$

$$\text{خطا} = 1 - \left(\frac{\text{ضریب حساسیت} + \text{ضریب تعیین}}{2}\right) \qquad (۶)$$

$$\text{درجه بندی بدون خطا} = \left(\frac{\text{ضریب حساسیت} + \text{ضریب تعیین}}{2}\right) \qquad (۷)$$

TP: تعداد رکوردهایی که روش طبقه‌بندی آنها را به درستی به دسته‌ای که به آن تعلق دارند، تشخیص داده است.

TN: تعداد رکوردهایی که روش طبقه‌بندی آنها را به درستی به دسته‌ای که به آن تعلق ندارند، تشخیص داده است.

FP : تعداد رکوردهایی که روش طبقه‌بندی آنها را به نادرستی به دسته‌ای که به آن تعلق دارند، تشخیص داده است.

FN: تعداد رکوردهایی که روش طبقه‌بندی آنها را به نادرستی به دسته‌ای که به آن تعلق ندارند، تشخیص داده است.

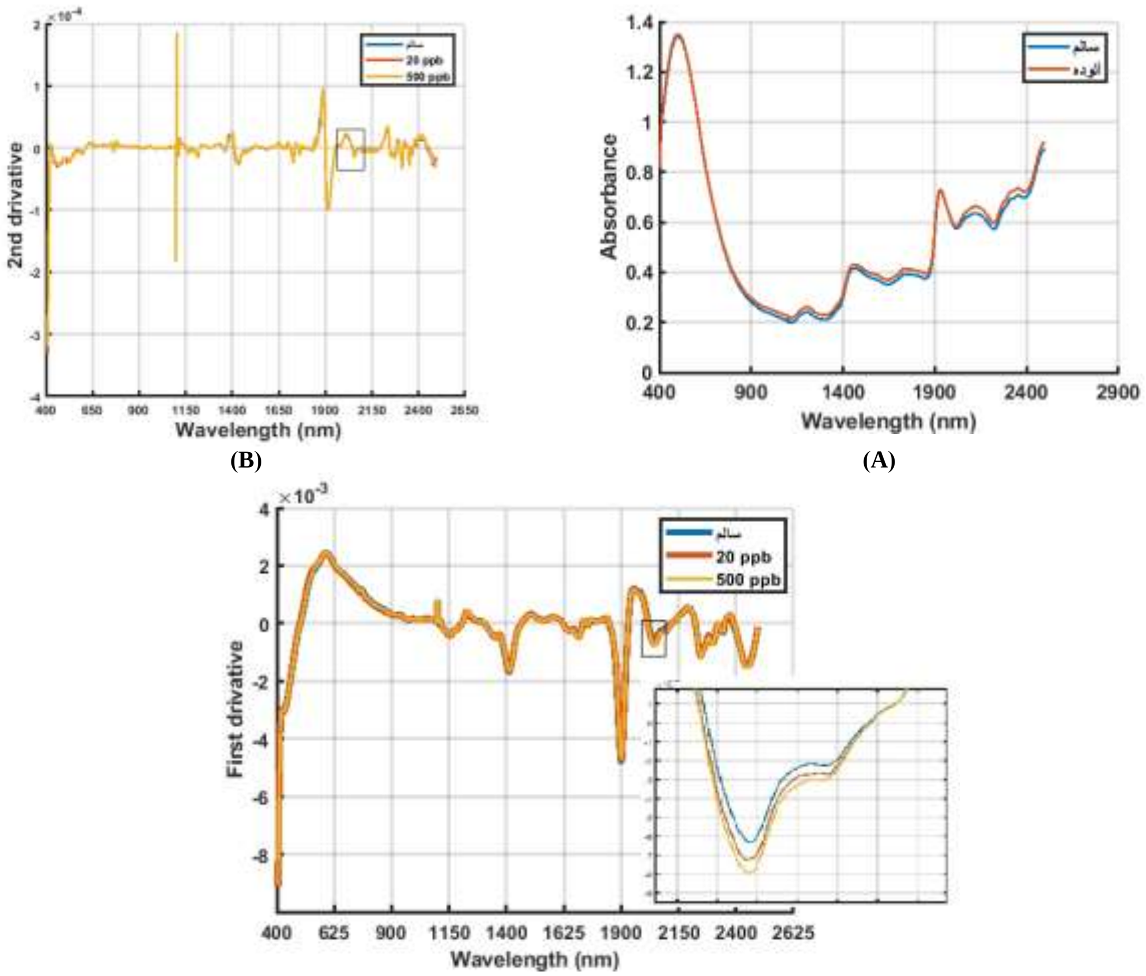
نتایج و بحث

در شرایط طبیعی و در مواردی که میزان رطوبت دانه کاکائو از حدی بیشتر باشد کپک های قارچی شروع به رشد و تکثیر می‌کنند که در نتیجه در صورت مهیا شدن شرایط ویژه از قبیل میزان معین نور و

1 Binary
2 Savitzy Goly Smoothing
3 Derivative
4 Sensitivity
5 Specificity
6 Error Rate
7 Not Error Rate

دما و وقوع برخی فعل و انفعالات شیمیایی این کپک‌های قارچی سم آفلاتوکسین تولید می‌کنند (Copetti *et al.*, 2013) اما در مورد تحقیقی حاظر با توجه به اینکه سم آماده آفلاتوکسین مستقیما بر روی دانه‌ها ریخته شده است لذا هیچ‌گونه تولید و تکثیر کپک قارچی وجود نداشته است و صرفا وجود سم و میزان آن مورد بررسی و دسته‌بندی قرار گرفته است.

مقدار متوسط طیف خام مربوط به دانه‌های کاکائو سالم و دانه‌های کاکائو آلوده به آفلاتوکسین و نیز مقادیر این طیف‌ها بعد از اعمال پیش تیمار مشتق اول و دوم ساویتزی گولی در شکل ۲-A، B و C به‌ترتیب نشان داده شده است. با مقایسه میزان متوسط طیف انعکاسی مادون قرمز مشاهده می‌شود که دانه‌های سالم دارای شدت انعکاس کمتری نسبت به دانه‌های آلوده هستند. همچنین از نمودار شکل ۲-B و ۳-C تعدادی حداکثر و حداقل محلی مشخص می‌شود که در این نقاط اختلاف شدت انعکاسی بارزتر از جاهای دیگر است و این پدیده به‌علت متفاوت بودن غلظت سم در دانه‌های کاکائو است.



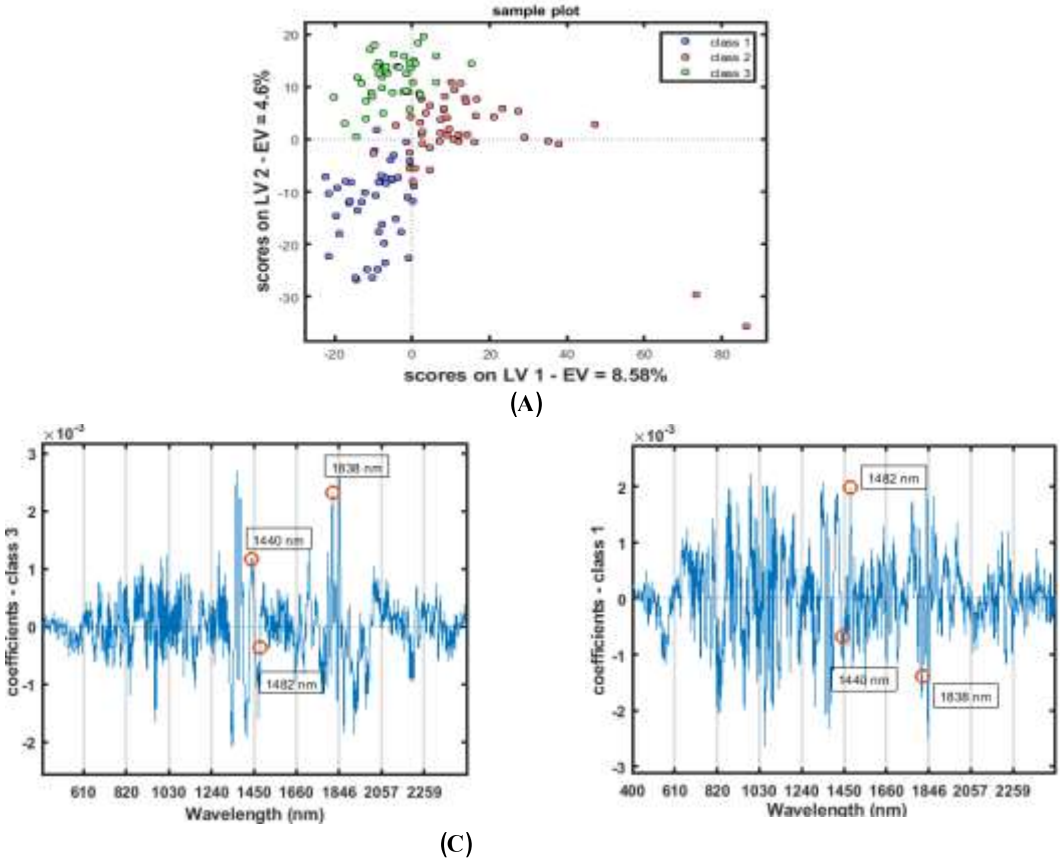
شکل ۲- (A) نمودار میانگین طیف مادون قرمز برای دانه‌های کاکائو آلوده به افلاتوکسین و دانه‌های غیرآلوده (B) نمودار طیف پیش تیمار شده با استفاده از مشتق دوم ساویتزی- گولی (C) نمودار طیف پیش تیمار شده با استفاده از مشتق اول ساویتزی- گولی

Fig. 2. (A) Graph of mean infrared spectrum for aflatoxin-contaminated cocoa beans and non-contaminated beans. (B) Graphs of pretreated spectra using the Savitzky-Golay second derivative. (C) Graphs of pretreated spectra using the Savitzky-Golay first derivative.

همانطور که از شکل ۳-A مشخص است پس از اعمال پیش تیمار مشتق دوم ساویتزی گولی و انجام کلاس‌بندی PLS-DA با به‌کار بردن دو متغییر پنهان اولیه (Latent Variable) تمایز بین دسته‌ها به‌خوبی قابل رویت است. با نگاه کردن به نمودار امتیازات در شکل (۳-A) می‌توان الگوی جالبی را در پراکنش نمونه‌ها مشاهده کرد. همانطور که از نتایج درجه‌بندی مشخص است مقداری هم‌پوشانی بین نمونه‌های دسته سوم با دسته دوم وجود دارد ولی مقدار آن خیلی کم است. همچنین میزان هم‌پوشانی بین دسته سوم و اول تقریبا وجود ندارد و

بین کلاس دوم و اول نیز به میزان ناچیز است. نمونه‌های کلاس سوم و اول روی LV اول امتیاز منفی دارند ولی نمونه‌های کلاس دوم روی LV اول امتیاز مثبت دارند. میزان جدایش نمونه‌ها بر روی LV دوم مشخص‌تر است با این وجود نمونه‌های دسته دوم و اول در این LV امتیاز نزدیک‌تری به هم دارند.

به‌منظور توضیح بیشتر نتایج، نمودار ضرایب تاثیر[1] طول موج‌ها برای داده‌های کالیبراسیون دسته اول (نمونه‌های بدون آلودگی آفلاتوکسین) و دسته سوم (نمونه‌های دارای آلودگی ppb ۵۰۰) در شکل ۳-B و C نمایش داده شده است. در این نمودار طول موج‌های کلیدی که در آن‌ها اختلاف بین دانه‌های آلوده به آفلاتوکسین و دانه‌های سالم به بیشترین میزان رسیده نشان داده شده‌اند. پیک‌های مشاهده شده در طول موج‌های ۱۴۴۰ نانومتر و ۱۴۸۲ نانومتر مطابق با اورتون اول پیوند O-H کششی است که می‌تواند به آلودگی قارچی ربط داده شود (Berardo *et al.*, 2005; Sirisomboon *et al.*, 2013). همچنین پیک موجود در ۱۸۳۸ نانومتر مربوط به پیوند C-H کششی است که می‌تواند به گروه‌های CH_2 مربوط باشد.



شکل ۳- (A)- نموار امتیاز بر روی متغیرهای پنهان (Score on latent variables)برای داده های کالیبراسیون (B)- نمودار ضرایب رگرسیونی برای کلاس ۱ (نمونه های بدون آلودگی آفلاتوکسین). (C)- نمودار ضرایب رگرسیونی برای کلاس ۳ (نمونه های دارای آلودگی آفلاتوکسین به میزان ۵۰۰ppb)

Fig. 3. (A) Score on latent variables for calibration data. (B) Regression coefficients for class 1 (samples without any infections). (C) Regression coefficients for class 3 (samples infected with 500ppb aflatoxin poison) (c).

در جدول ۱، پارامترهای دسته‌بندی براساس مدل PLS-DA جمع‌بندی شده است. با بررسی نتایج به‌دست آمده از قسمت کالیبراسیون، اعتبارسنجی متقابل و تست مشخص می‌گردد که میزان خطای درجه‌بندی (ER) و نیز میزان درجه‌بندی بدون خطا (NER) در حالت پیش تیمار با مشتق مرتبه دوم ساویتزی گولی به‌ترتیب کمترین و بیشترین مقدار را دارا می‌باشد. همچنین در این پیش تیمار برای مدل کالیبراسیون و تست میزان ضریب تعیین برای نمونه‌های دسته اول، دوم و سوم برابر ۱/۰۰ می‌باشد و این بدین معنی است که همه دسته‌ها به‌صورت صحیح درجه‌بندی شده‌اند.

1 Coefficients

جدول ۱- نتایج طبقه‌بندی داده‌های آفلاتوکسین دانه کاکائو با استفاده از PLS-DA

Table 1- The result of infected and healthy cocoa bean classification using PLS-DA

				دسته ۱		دسته ۲		دسته ۳		
		NER	**ER**	**Specificity**	**Sensitivity**	**Specificity**	**Sensitivity**	**Specificity**	**Sensitivity**	**Not assigned**
Raw Data	**Calibration**	0.99	0.01	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.98	0.01
	Cross validation	0.94	0.06	0.97	0.95	0.96	0.90	0.98	0.97	0.11
	Test set	0.97	0.03	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	0.92	0.15
First derivative	**Calibration**	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.01
	Cross validation	0.98	0.02	1.00	1.00	0.99	0.95	0.97	0.98	0.06
	Test set	0.92	0.08	1.00	1.00	0.95	0.90	0.96	0.86	0.12
Second derivative	**Calibration**	**1.00**	**0.00**	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	Cross validation	**0.98**	**0.02**	1.00	1.00	1.00	0.95	0.97	1.00	0.08
	Test set	**1.00**	**0.00**	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.09

در مدل اعتبارسنجی متقابل مقدار ضریب تعیین برای دسته سوم (نمونه های دارای آلودگی ۵۰۰ppb) برابر ۹۷ درصد است. و بیانگر این نکته است که ۹۷ درصد دانه‌های آلوده بصورت صحیح در دسته سوم درجه‌بندی شده اند و تنها ۳ درصد در سایر گروه‌ها به اشتباه درجه‌بندی شده‌اند (Ballabio & Consonni, 2013). همچنین در پیش تیمار طیفی با روش مشتق دوم عدد ۱/۰۰ برای پارامتر ضریب حساسیت دسته سوم در سه گروه داده: کالیبراسیون، Cross Validation و تست بیانگر این است که هیچ کدام از نمونه‌های دسته سوم به‌صورت غلط در سایر دسته‌ها طبقه‌بندی نشدند. به همین ترتیب می‌توان گفت عدد ۰/۹۵ برای پارامتر ضریب حساسیت دسته دوم در سه گروه داده ذکر شده بیانگر این است که تنها ۰/۰۵ نمونه‌های مربوط به دسته دوم به‌صورت غلط در دو دسته دیگر طبقه‌بندی شده‌اند.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان‌دهنده قابلیت استفاده از روش طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک برای شناسایی و دسته‌بندی دانه‌های کاکائو آلوده به سم آفلاتوکسین است. در این تحقیق غلظت های بالا (۵۰ ppb) و و پایین (۲۰ ppb) سم آفلاتوکسین توسط روش طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک مورد آزمایش قرار گرفت. این روش با به‌کار بردن پیش تیمار مشتق مرتبه دوم ساویتزی گولی و مدل PLS-DA توانست با موفقیت دانه‌های کاکائو را به گروه‌های آلوده به آفلاتوکسین و گروه بدون آلودگی دسته‌بندی نماید. نتایج بررسی نمودار ضرایب تاثیر متغییرهای مستقل (طول موج‌های طیفی از جمله ۱۴۴۰، ۱۴۸۲ و ۱۸۳۸ نانومتر نشان داد که با افزایش غلظت سم، مقدار ضریب تاثیر متغییرهای مستقل در هر دسته کاهش می‌یابد. در نهایت می‌توان گفت که روش تشخیص آلودگی آفلاتوکسین با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز روشی کارا، غیرمخرب و سریع می‌باشد که می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های دستی و سنتی باشد. همچنین با درجه‌بندی و تشخیص دقیق سم آفلاتوکسین می‌توان روش‌هایی اتخاذ نمود تا در مراحل بعدی دانه‌های آلوده با انواع روش‌های سم‌زدایی (دتوکسیفای) رفع آلودگی گردند.

منابع

1. Al-Holy, M. A., Lin, M., Cavinato, A. G., & Rasco, B. A. (2006). The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate Escherichia coli O157: H7 from other bacteria inoculated into apple juice. *Food microbiology*, *23*(2), 162-168. https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.017
2. Ardhana, M. M & ,.Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International journal of food microbiology*, *86*(1-2), 87-99. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3
3. Ballabio, D., & Consonni, V. (2013). Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Analytical Methods*, *5*(16), 3790-3798. https://doi.org/10.1039/C3AY40582F
4. Berardo, N., Pisacane, V., Battilani, P., Scandolara, A., Pietri, A., & Marocco, A. (2005). Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(21), 8128-8134. https://doi.org/10.1021/jf0512297
5. Broadent, J., & Oyeniran, J. (1968). *A new look at mouldy cocoa.* Paper presented at the Proceeding 1st International Biodeterioration Symposium.
6. Camps, C., & Christen, D. (2009). Non-destructive assessment of apricot fruit quality by portable visible-near infrared spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, *42*(6), 1125-1131. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.01.015

7. Chen, H., Song, Q., Tang, G., Feng, Q., & Lin, L. (2013). The combined optimization of Savitzky-Golay smoothing and multiplicative scatter correction for FT-NIR PLS models. *International Scholarly Research Notices, 2013*. http://dx.doi.org/10.1155/2013/642190
8. Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Lemes, D. P., Nakano, F., & Taniwaki, M. H. (2012). Determination of aflatoxins in by-products of industrial processing of cocoa beans .*Food Additives & Contaminants: Part A, 29*(6), 972-978. https://doi.org/10.1080/19440049.2012.660657
9. Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., & Taniwaki, M. H. (2013). Fungi and mycotoxin occurrence in cocoa *Chocolate in Health and Nutrition* (pp. 61-71): Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0_5
10. Fernández-Ibañez, V., Soldado, A., Martínez-Fernández, A., & De la Roza-Delgado, B. (2009). Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in maize and barley as analytical quality assessment. *Food Chemistry, 113*(2), 629-634. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.049
11. Hernández-Hierro, J., García-Villanova, R & ,.González-Martín, I. (2008). Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. *Analytica chimica acta, 622*(1-2), 189-194. https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.049
12. Kandpal, L. M., Lee, S., Kim, M. S ,.Bae, H., & Cho, B.-K. (2015). Short wave infrared (SWIR) hyperspectral imaging technique for examination of aflatoxin B1 (AFB1) on corn kernels. *Food Control, 51*, 171-176. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.020
13. Khodabakhshian, R., Emadi, B., Khojastehpour, M., Golzarian, M.R. 2016. Determination of pomegranate ripeness and internal defects using VIS-NIR multispectral imaging. *PhD dissertation,Ferdowsi University of Mashhad*.
14. Magan, N., & Aldred, D. (2005). Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants, 22*(s1), 10-16. https://doi.org/10.1080/02652030500412154
15. Mobli, H., Jamshidi, B., Azizi, A., & Sharifi, M. (2020). Microbial Contamination Assessment of Lettuce using NIR Hyperspectral Imaging: Case Study on Escherichia coli .*Iranian Journal of Biosystems Engineering, 51*(3), 599-610
16. Mohammadi Monavar, H., Mirzaee, S., Sepehr, B. 2016. Grading of aflatoxin contamination of pistachios by non-destructive near infrared spectroscopy NIR. Secound *International Conference on Sustainable Development, Strategies and Challenges Focusing on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism, Tabriz*
17. Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P. R., & Guiraud, J.-P. (2008). Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology, 121*(2), 234-241. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.017
18. Nicolai, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I., et al. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest biology and technology, 46*(2), 99-118. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.024
19. Pettersson, H., & Åberg, L. (2003). Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control, 14*(4), 229-232. https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00011-2
20. Ribeiro, N. d. A., Bezerra, J., & Lopez, A. (1986). Micobiota na fermentação do cacau no estado da Bahia, Brasil. *Revista Theobroma (Brasil) v. 16 (1) p. 47-55*
21. Roelofsen, P. (1958). Fermentation, drying, and storage of cacao beans *Advances in food research* (Vol. 8, pp. 225-296): Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60021-X
22. Sánchez-Hervás, M., Gil, J., Bisbal, F., Ramón, D & ,.Martínez-Culebras, P. (2008). Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International journal of food microbiology, 125*(3), 336-340. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.021
23. Singh, C., Jayas, D., Paliwal, J., & White, N. (2012). Fungal damage detection in wheat using short-wave near-infrared hyperspectral and digital colour imaging. *International Journal of Food Properties, 15*(1), 11-24. https://doi.org/10.1080/10942911003687223
24. Sirisomboon, C. D., Putthang, R., & Sirisomboon, P. (2013). Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice. *Food Control, 33*(1), 207-214. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.034
25. Sirisomboon, P., Tanaka, M., Fujita, S., & Kojima, T. (2007). Evaluation of pectin constituents of Japanese pear by near infrared spectroscopy. *Journal of food engineering, 78*(2), 701-707. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.009
26. Zhang, H.-J., Wu, J.-H., Li-jun, Y. L., Hua, Y., YU, X.-q., WANG, X.-s., et al. (2007). Comparison of near infrared spectroscopy models for determining protein and amylose contents between calibration samples of recombinant inbred lines and conventional varieties of rice. *Agricultural Sciences in China, 6*(8), 941-948 https://doi.org/10.1016/S1671-2927(07)60132-1